

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-043090

(43)Date of publication of application : 25.02.1991

(51)Int.Cl.

C12P 7/04

(21)Application number : 01-177716

(71)Applicant : SHOWA DENKO KK

(22)Date of filing : 10.07.1989

(72)Inventor : OKURA ICHIRO

(54) PRODUCTION OF N-ALKANOL

(57)Abstract:

PURPOSE: To selectively obtain 1-12C n-alkanol useful as a synthetic intermediate for various chemicals by reacting an n-alkane with an enzyme in the presence of a cell containing methane monooxygenase poisoned with cyclopropane in an aqueous medium.

CONSTITUTION: In reacting an n-alkane with an enzyme in the presence of a cell containing methane monooxygenase, in an aqueous medium, methanol dehydrogenase is previously poisoned with cyclopropane. Methylosinus trichosporium OB3b (FERM P-4981) may be cited as the enzyme.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-43090

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)2月25日

C 12 P 7/04

6742-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 n-アルカノールの製造方法

⑯ 特 願 平1-177716

⑰ 出 願 平1(1989)7月10日

特許法第30条第1項適用 平成元年3月14日、社団法人日本化学会発行の「日本化学会第58春季年会講演予稿集Ⅱ」に発表

⑱ 発 明 者 大 倉 一 郎 東京都板橋区東新町2-1-8

⑲ 出 願 人 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門1丁目13番9号

⑳ 代 理 人 弁理士 大家 邦久

明 細 書

1. 発明の名称

n-アルカノールの製造方法

2. 特許請求の範囲

シクロプロパンにより被毒させたメタンモノオキシゲナーゼ保有菌体の存在下にn-アルカンと酸素を水性媒体中で反応させることを特徴とするn-アルカノールの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の化学品の合成中間体として有用な炭素数1~12のn-アルカノールを、n-アルカンの微生物学的な酸化により選択的に製造する方法に関するものである。

従来の技術及びその課題

アルカン類を緩和な条件下で酸化する方法として、微生物学的方法(発酵法)が知られているが、アルカンから直接低級アルカノールを選択的に製造する方法は確立されていない。

発酵法により得られるアルコールの種類は極めて限られており、一方、合成法によるアルコールの製造は多くの反応工程を必要としている。

メタンオキシゲナーゼ(以下、MMOと略記する。)最も不活性な基質であるメタンに有効に作用し、メタノールを生産することが知られている。

MMOは完全に単離する方法が複雑であり、その工業的利用目的のためには、通常はそれを保有する菌体をそのまま用いることが行なわれる。

MMOを保有する菌体はアルコールデヒドロゲナーゼ等を同時に保有しており、例えば、メタンの場合には、酸化されて生ずるメタノールはホルムアルデヒドに変化し、ギ酸を経て炭酸ガスにまで酸化されるのが通常である。

Methylococcus capsulatus, Methylosinus tricosporium OB3bなどのメタン酸化菌からMMOは分離精製されているが、単離されたMMOは非常に不安定であり、メタンの酸化にそのまま用いることは不適當である。

他方、MMOを保有する菌体は安定であるから、この菌体をそのまま用いることにより長時間の使用が可能となる。

しかし、菌体をそのまま用いると菌体内に存在するメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)の作用により、メタノールはさらに酸化を受け二酸化炭素にまで酸化される。

メタン以外のアルカンの場合には、炭酸ガスにまでは酸化されないが、アルデヒド、ケトン、エポキシドなど種々の酸化生成物を生じ、アルコールの段階で反応を止めることは困難である。

課題を解決するための手段

本発明者は、アルコールデヒドロゲナーゼの作用のみを選択的に阻害し、MMOのみを有効に働かせる方法について鋭意検索した結果、菌体の培養後、あらかじめシクロプロパンガスで培養液を処理することにより目的を達成することが出来ることを見だし本発明を完成した。

すなわち、本発明はメタンモノオキシゲナーゼ保有菌体の存在下n-アルカンと酸素を水性媒体

中で反応させるにあたり、メタノールデヒドロゲナーゼをあらかじめシクロプロパンにより被毒させておくことを特徴とするn-アルカノールの製造方法を提供したものである。

作用

シクロプロパンが、アルコールデヒドロゲナーゼを選択的に阻害する作用メカニズムの詳細は明らかではないが、シクロプロパンがMMOにより酸化されて生成するシクロプロピルアルコールがアルコールデヒドロゲナーゼの活性部位に吸着されて補酵素であるピロロキノンキノリンと反応して失活を起こすものと推測される。

発明の構成

本発明の方法において使用するメタンモノオキシゲナーゼはメタンを炭素およびエネルギー源として利用できるメタン質化菌〔一般にメチロトロフス(methylotrophs)といわれている。〕に広く存在することが知られている。

本発明で使用する酵素源は特に限定されず、例えばメチロモナス・メタニカ(Methylomonas

methanica)、メチロコッカス・カプスラツス(バス菌株)[Methylococcus capsulatus(Bath)]、メチロシヌス・トリコスポリウム(OB3b)(Methylosinus trichosporium)、メチロシヌス・エス・ビー・CRL31(Methylosinus sp. CRL31)などが挙げられ、例えばメチロシヌス・トリコスポリウムOB3b(微工研寄託番号第4981号)の場合には鳥取大学研などで保存されている。

メタンモノオキシゲナーゼ生産菌を培養するための培地としては、炭素源、窒素源、無機物及び必要に応じて少量の栄養素を含むものであれば、合成培地、天然培地のいずれも使用できる。

培養はメタンの存在下で、振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好気的条件下で行なう。培養温度は20~40℃の範囲、通常は30℃程度で行なう。培養液のpHは中性域が好ましい。

培養菌体からのメタンモノオキシゲナーゼの抽出は、公知の方法、例えばI. J. Higgins等、J. General Microbiology 125, 63-72(1981)に記

載されている方法によって行なうことができる。

しかし、本発明の方法では、メタンオキシゲナーゼは必ずしも抽出された純粋な酵素である必要はない。

すなわち、メタンモノオキシゲナーゼ生産菌の培養物、培養物から遠心分離などの方法によって採取した生菌体、その乾燥菌体あるいは菌体を磨砕、自己消化、超音波処理などすることによって得られる菌体処理物、これらの菌体からの抽出物、その抽出物より得られる酵素の粗製物も利用できる。

勿論、上記の酵素あるいは酵素含有粗製物は不溶化(固定化 immobilized)したものでよい。

本発明の方法は、反応基質のn-アルカンを無菌的に作成したpH 7.0付近の緩衝溶液中で空気と接触させておいて、前記の菌体あるいは酵素含有液を少量接種することにより行なわれる。

反応は緩和な条件、すなわち常圧下、30℃付近の温度で行なうことができる。

メタンあるいはn-アルカンと空気との接触は、

バッチ式でも連続式でもよい。

反応の経過は、ガスクロマトグラフィーで分析し、目的とする n -アルコールの選択率が最適な値となったところで反応を止め、常法により n -アルコールを分離回収する。

実施例

〔メタンモノオキシゲナーゼ生産菌の培養〕

下記の成分を含む無機培地を調整した。

成 分	水 1 l に溶かす量
K_2HPO_4	0.7 g
KH_2PO_4	0.54 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0 g
NH_4Cl	0.5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	100 μ g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	30 μ g
H_3BO_4	300 μ g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200 μ g

密栓した後容器内の空気を抜きシクロプロパンを1.5 ml 注入し、30℃で5分間攪拌した。その後、ヘリウムガスを2分間バブリングさせてシクロプロパンを除去した。

次に、反応容器中にメタン 1×10^{-4} mol、酸素 8×10^{-5} mol となるように仕込み所定時間反応を行なった。

2時間後にメタノール 2×10^{-6} mol が生成していた。

比較例 1

シクロプロパン処理を行なわなかったこと以外は実施例 1 と同様にして反応を行ない比較したところ、メタノールの生成は1時間後に 0.4×10^{-6} mol のみであり、2時間後には検出出来なかった。

実施例 2 〔エタンの酸化〕

メタンの代わりにエタンを 1×10^{-4} mol 仕込んで実施例 1 と同様に所定時間反応を行なったところ、50分間で 15×10^{-6} mol のエタノールが生成していた。アセトアルデヒドの副生はこ

$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	10 μ g
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	20 μ g
$Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$	30 μ g

pH 7.0に調整した上記液体培地に、メチロシヌス・トリコスボリウムOB3bを接種し、メタンガスと空気を1:1の容量比で入れて30℃にて20時間振盪培養した。

〔シクロプロパンによる菌体の被害〕

メチロトロフスの培養終了後、遠心分離して集めた菌体を0.1M-リン酸緩衝液(pH 7.0)で洗浄後同様の緩衝液に懸濁した。

次に、空気をシクロプロパンに置換し、シクロプロパン接触下に菌体懸濁液を30℃で激しく攪拌した。その後ヘリウムガスをバブリングすることにより系内からシクロプロパンを除去し、次の反応に用いた。

実施例 1 〔メタンの酸化〕

10 ml 反応容器に0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 2.0 ml、菌体懸濁液を乾燥重量換算で6~8 mgおよびギ酸ナトリウム490 μ mol を入れて

く僅かであった。

比較例 2

シクロプロパン処理を行なわなかったこと以外は実施例 2 と同様にして反応を行ない比較したところ、50分間でエタノールとアセトアルデヒドは共に 7.5×10^{-6} mol 生成しており、75分間ではエタノールは消失し、アセトアルデヒドが 12×10^{-6} mol 生成していた。

実施例 3 〔プロパンの酸化〕

メタンの代わりにプロパンを 1×10^{-4} mol 仕込んで実施例 1 と同様に反応を行なさせた。

100分後 1×10^{-6} mol の1-プロパノールが生成し、プロピオンアルデヒドは検出されなかった。

比較例 3

シクロプロパン処理を行なわなかったこと以外は実施例 3 と同様にして反応を行ない比較したところ、100分後に2-プロパノール 6×10^{-6} mol とアセトン 2×10^{-6} mol が生成していた。

実施例 4 〔ブタンの酸化〕

メタンの代りにブタンを 1×10^{-4} mol 仕込んで実施例1と同様に反応を行なった。

2時間後 0.1×10^{-6} molの1-ブタノールの生成が検出され、1-ブチルアルデヒドは全く検出されなかった。

比較例4

シクロプロパン処理を行なわなかったこと以外は実施例4と同様にして反応を行なった。2時間後に2-ブタノールと2-ブタノンが同量 5×10^{-6} mol生成していた。

特許出願人 昭和電工株式会社

代理人 弁理士 大 家 邦 久